

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **60083584 A**

(43) Date of publication of application: **11.05.85**

(51) Int. Cl

C12N 15/00

(21) Application number: **58191379**

(22) Date of filing: **13.10.83**

(71) Applicant: **RIKAGAKU KENKYUSHO**

(72) Inventor:
KASUYA KEIKO
IGAWA YOJI
TSUKAGOSHI MIKIRO
KURATA SHUNICHI

**(54) METHOD FOR INGRESSION OF SUBSTANCE
INTO LIVE CELL**

(57) Abstract:

PURPOSE: To insert a substance efficiently into a very large amount of live cells, by improving the surface conditions of the live cells by irradiation with laser beams to give a state for incorporating the substance, and associating the substance with the live cells in a medium containing the substance to be incorporated in the cells.

CONSTITUTION: Live cells are perforated by irradiation with laser beams and then associated with a substance to

be incorporated therein in a medium, e.g. a culture medium of the live cells, containing the substance to be incorporated therein. Thus, the above-mentioned substance is incorporated in the live cells, and holes are closed by the reparative function of the live cells to contain the substance in the holes of the live cells. A biopolymer, e.g. gene or protein, may be cited as the substance. The irradiation time of the laser beams must be adjusted not to kill the live cells in perforation by irradiation with the laser beams. As a means, the laser beams are shaped in the pulse form to limit the irradiation time.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&Japio

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

昭 62-7838

⑬ Int. Cl.

C 12 N 15/00
1/00
5/00
13/00

識別記号

庁内整理番号

7115-4B
U-6712-4B
7115-4B
7823-4B

⑭ 公告 昭和62年(1987)2月19日

発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 生細胞内への物質移入法

⑯ 特 願 昭58-191379

⑰ 公 開 昭60-83584

⑱ 出 願 昭58(1983)10月13日

⑲ 昭60(1985)5月11日

⑳ 発 明 者 梶 谷 敬 宏 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
 ㉑ 発 明 者 井 川 洋 二 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
 ㉒ 発 明 者 塚 越 幹 郎 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
 ㉓ 発 明 者 倉 田 俊 一 東京都府中市片町3-3-1
 ㉔ 出 願 人 理 化 学 研 究 所 和光市広沢2番1号
 ㉕ 出 願 人 科 学 技 術 庁 長 官
 ㉖ 代 理 人 弁 理 士 中 村 稔 外3名
 審 査 官 広 田 雅 紀

1

2

㉗ 特許請求の範囲

1 生細胞にレーザー光を照射し、生細胞内に取
 込もうとする物質を含む媒質内でその物質と生細
 胞とを会合させ生細胞内に物質を取込ませるこ
 とを特徴とする生細胞内への物質移入法。

2 前記のレーザー光はパルス状である特許請求
 の範囲第1項に記載の生細胞内への物質移入法。

3 前記のレーザー光は連続状であり、レーザー
 光の照射域を通して前記の生細胞を搬送する特許
 請求の範囲第1項に記載の生細胞内への物質移入
 法。

4 前記のレーザー光は連続状であり、前記の媒
 質が生細胞を含みレーザー光が前記の媒質を掃引
 する特許請求の範囲第1項に記載の生細胞内への
 物質移入法。

5 前記の媒質が前記の生細胞の培養液である特
 許請求の範囲第4項に記載の生細胞内への物質移
 入法。

6 前記の物質は生体高分子であることを特徴と
 する特許請求の範囲第1項に記載の生細胞内への
 物質移入法。

発明の詳細な説明

本発明は生細胞内へ物質を移入する方法に係る
 ものである。

遺伝子発現を解析する分野では、生物の形質を
 決定する多くの遺伝子のはたらきを解明するため
 に特定の遺伝子を生細胞内へ移入し、その移入さ
 れた細胞の形質の変化(形質変化)を観察するこ
 とが行なわれる。

例えば癌化した細胞からDNAを抽出し、これ
 を切断し細分化する。そして特定の断片を正常細
 胞に移入してもし癌化が検出できればそのDNA
 断片に発癌性遺伝子が含まれているということが
 できる。

このようなDNAを細胞内に組込む従来技術と
 しては、DNAを含有する溶液に生細胞を懸濁
 し、光学顕微鏡下で極く細い針状物により生細胞
 に小さな穴をあけ、その穴からDNAを取込ま
 せ、そして生細胞が穴を修復することにより細胞
 内にDNAを組込ませる方法(特願昭56-
 171347、特開昭58-76091参照)と、培養液中に
 DNAをリン酸カルシウム沈澱として存在させ、
 食作用で細胞内へ移入する方法とがある。しか
 し、これらの方法にはいくつかの欠点がある。前
 者は移入効率はすぐれているが、針状物を利用し
 て生細胞に穴をあけるのであるから生常細胞を損
 傷させることなくDNAを移入するには熟練と多
 大の労力を必要とする。また細胞によっては穴を

3

あけることができずこの物質移入法を利用することはできない。

後者は多くの細胞を一度に処理できる反面、DNAの移入確率は非常に低く、せいぜい1万分の1程度である。形質交換効率は非常に小さいので非常に多くの細胞にDNAの断片を組込ませることが要請される。また、この方法は培養液中に高濃度のリン酸カルシウム塩を入れることから細胞に与える損傷も大きくその後の解析に注意を要する。

本発明の目的は上に述べた欠点のない、極めて大量の生細胞へ効率よく物質を移入することのできる生細胞内への物質移入法を提供することにある。

この目的は本発明に従つて、生細胞にレーザー光を照射し、その照射部分の細胞の表面状態を改変して物質を取込める状態とし（以下この状態を説明の便宜上仮に「穴」又は「穿孔された状態」という）、それから細胞内に取込もうとする物質を含む媒質内でその物質と細胞とを会合させ細胞内に物質を取込ませることにより達成される。

生細胞内に取込ませる物質としては、生体高分子例えば遺伝子、タンパク質等がある。

レーザー光は指向性が優れており、これを顕微鏡に導入するとその限界分解能まで小さな焦点を結ばせることができ、これによつて細胞試料にサブミクロンの微小な「穴」をうがつことができる。又、レーザーは時間巾の短いパルスとして発射することができるので時間巾を調整すれば体積の小さな細胞の温度をたかめてこれを殺してしまうということもない。更に、レーザー光は単一波長であるので細胞壁や生体膜あるいは細胞内に取込ませようとする物質の光学的特性（吸収率、吸収分光性）を考慮してその波長を選択すれば異なる種類の細胞にも「穿孔」できる。レーザー光の使用は電気制御系又はTVモニターとの連携を容易とし、それにより穿孔作業の迅速且つ精確な制御が可能となる。レーザー光の強度は電氣的に広範囲に制御することができ、又細胞内への焦点の深さを自由に光学的に調整し得る。このことも、生細胞の手術に有利である。

本発明ではこのレーザー光の特性を利用して生細胞の修復機能を損なわない細胞手術を、極めて高い効率で、実施する。

4

既に述べたように、本発明によれば生細胞にレーザー光を照射して生細胞に「穿孔」し、細胞内に取込もうとする物質を含む媒質内でその物質と細胞とを会合させ生細胞内に物質を取込ませ、そして生細胞の修復機能により孔を閉じてその中に物質を封じ込めるのである。

レーザー光の照射により「穿孔」はするが、「穿孔」の際の熱により生細胞を殺してはならない。そのためレーザー光の照射時間の調整が必要となるが、その手段の一つとしてレーザー光をパルス状とし照射時間を制限する。又、連続状のレーザーで生細胞を次々に短時間照射する。例えば、細胞内に取込もうとする物質と生細胞を含む培養液をレーザー光の照射域を通して移動させるか、又は培養液中に懸濁している大量の生細胞をレーザー光で掃引する。いずれの場合も取込もうとする物質と生細胞とは培養液中に共存していて、「穿孔」された直後にその生細胞の付近の物質がその孔から生細胞内に取込まれる。液浴中に静止している生細胞については、顕微鏡下で個々の生細胞の特定の選択位置にレーザー光を照射することもできる。

又、パルス状もしくは連続状のレーザー光の照射域に生細胞を含む搬送液体を点滴して、その粒滴内の生細胞を「穿孔」し、それからそれらの粒滴をレーザー光の照射域直下の、生細胞に取込もうとする物質の懸濁浴に落下させるようにしてもよい。パルス状レーザー光を使用した場合には別の光源により各粒滴を照明して散乱光の広がりから粒滴内の細胞の大きさを決定して細胞を選別し、特定の細胞にレーザーパルスを照射することもできる。

点滴の代りに、生細胞を含む搬送液体をパルス状又は連続状のレーザー光の照射域に流してもよく、これは高速処理に特に適している。

第1図は本発明により物質を移入した生細胞を、その物質を移入されなかつたため死んだ細胞とを対比して示す細胞形態の顕微鏡写真である。

すなわち、オスボーンメンデルラットの腎臓由来の媒養細胞NRKを大腸菌由来の遺伝子Ecogpt (Xanthine - guanine phosphoribosyl - Transferase) を取込まないと生存できない状態に処理し、このように処理したNRKを、前記の遺伝子を含む媒質 (DMEMに10%牛胎児血清

5

を加えたもの)に加えた。

レーザー本体(YAGレーザー)から発射される赤外線(波長1.06ミクロン)を紫外線(波長335ナノメートル)に変換してレーザー顕微鏡に導入し、顕微鏡下で前記の媒質中に懸垂している生細胞に閃光時間10ナノ秒のレーザーパルスを照射した。レーザーパルスは毎秒10パルスの率でくり返すので、多数個の細胞を同一条件で処理することができた。その結果を第1図の左半部に、パルスを照射しなかつた細胞(第1図の右半部)と対比して示す。

レーザー光を照射された生細胞は遺伝子を取込み生存しているのに対し、レーザー光を照射されなかつた生細胞はすべて死滅した。

生細胞は「穿孔」されるとその直後に修復してしまう。

第2図に前記のNRKがレーザー照射により「穿孔」された直後の様子をビデオで撮影収録した再生画面からの写真で示す。第2図Aは「穿孔された状態」を、第2図Bは「穿孔」直後の状態を、そして第2図Cは修復後の状態をそれぞれ示す(矢印は「穴」を示す)。

第3図はヒトの赤血球を染色し、これにレーザー光を照射して「穿孔」した状態を示す。この図

6

は生細胞に「穿孔」した直後の状態と同じ様相を示し、本発明の方法により細胞の特定箇所を選択して「穿孔」することができることを示している。

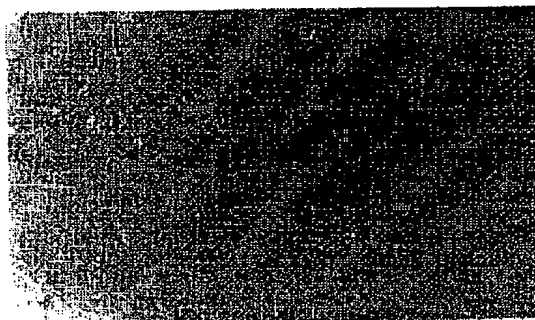
このように本発明により細胞に物質を移入する「穿孔」が可能であるばかりでなく、細胞の一部を切断したり融着したり、或は特定の細胞小器官を破壊するなどの基本的な細胞手術が可能である。

細胞内への遺伝子の移入に本発明を適用することにより、いろいろな有用物質の細胞内生産(例えばヒトの有用物質(インシュリン等)を生細胞内で合成)、家畜や農産物の品種改良のための遺伝子移入(交配しない異種間植物での遺伝子の置換;受精を経由しない増殖での優良遺伝子の導入)を実現することができる。

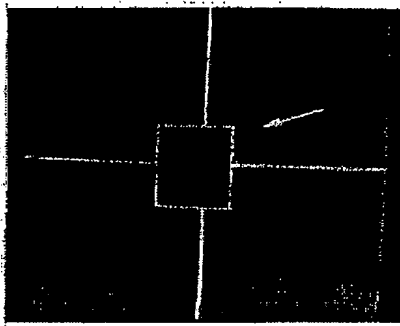
図面の簡単な説明

第1図は本発明に従つて遺伝子Ecogptを移入したNRK細胞の形態を示す顕微鏡写真であり、第2図は、NRK細胞のレーザー照射による「穿孔」及び修復状況を示すビデオ再生画面からの細胞の形態の顕微鏡写真である。第3図は「穿孔」した細胞(ヒトの赤血球)の形態を示す顕微鏡写真である。

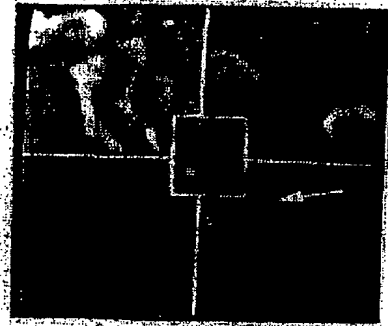
第1図



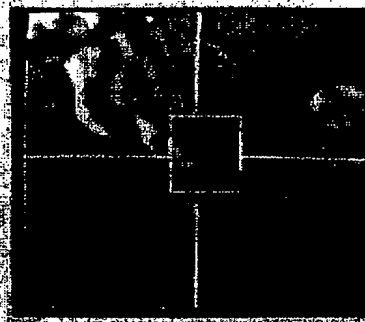
104



(A)



(B)



(C)

第 3 図

